

# 26. Ulusal ve 1. Uluslararası Farmakoloji Kongresi

10. Klinik Farmakoloji Sempozyumu

9. Klinik Toksikoloji Sempozyumu



## BİLDİRİ KİTABI

4-6 Kasım 2021

# 26<sup>th</sup> National and 1<sup>st</sup> International Pharmacology Congress

10<sup>th</sup> Clinical Pharmacology Symposium

9<sup>th</sup> Clinical Toxicology Symposium

## ABSTRACT BOOK

4-6 November 2021



Online

[www.farmakoloji2021.org](http://www.farmakoloji2021.org)



**Nlrx1 ligandı dokozahékzaenoik asidin LPS'nin neden olduğu enfamatuvár hiperaljeziyi önleyici etkisine TRAF6/IkB-α/NF-kB sinyal ileti yolunun etkinliğindeki azalma katkıda bulunmaktadır**

**Dilşah Ezgi YILMAZ**, Şefika Pınar ŞENOL, Meryem TEMİZ REŞİTOĞLU, Seyhan ŞAHAN FIRAT, Bahar TUNÇTAN

Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Mersin, Türkiye

**Amaç:** Bu çalışmada, lipopolisakkarit (LPS) ile farelerde oluşturulan enfamatuvár hiperaljezi modelinde dokozahékzaenoik asit (DHA)'nın tümör nekrozlaştırıcı faktör reseptörü ile ilişkili faktör (*tumor necrosis factor receptor-associated factor; TRAF*) 6/kB inhibitörü (*inhibitor of kB; IkB*) kinaz (*IkB kinase; IKK*)/IkB-α/nükleer faktör-κB (*nuclear factor-κB; NF-κB*) sinyal ileti yolu üzerindeki etkisinin antienflamatuvár nükleotit bağlayıcı oligomerizasyon alanı (*nucleotide binding oligomerization domain-like receptor; NLR* X1 (NLRX1) ile ilişkilendirilerek araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç-Yöntem:** Deneylerde kullanılan fareler 7 gruba ayrılmıştır: (1) Serum fizyolojik (SF), (2) LPS, (3) LPS+DHA (1 mg/kg), (4) LPS+DHA (2 mg/kg), (5) SF+DHA (3 mg/kg), (6) LPS+DHA (3 mg/kg) ve (7) LPS+DHA (10 mg/kg). DHA (10 ml/kg) SF (10 ml/kg) ya da LPS (10 mg/kg; 10 ml/kg) ile birlikte intraperitoneal yoldan uygulanmıştır. SF veya LPS enjeksiyonundan 6 saat sonra farelerin 30 saniye içinde termal uyarıya tepki verme süreleri değerlendirilmiştir. Deneyler sonunda farelerden beyin ve omurilik alınmıştır. Doku homojenitelerinde NLRX1 ile TRAF6, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , fosforile IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ , IKK $\gamma$ , fosforile IKK $\gamma$ , K63 veya K48 ile bağlantılı ubikuitinlenmiş (K63 U veya K48 U) proteinlerinin birliliklerindeki değişiklikleri belirleyebilmek amacıyla ko-immünopresipitasyon çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca, dokularda IkB-α, fosforile IkB-α, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65 ve interlökin (*interleukin; IL*)-1 $\beta$  proteinlerinin ekspresyonu *immunoblotting* yöntemiyle ölçülmüştür.

**Bulgular:** LPS uygulanmasından 6 saat sonra farelerin termal uyarıya yanıt verme sürelerinin kontrol grubundakilere göre anlamlı olarak daha az olduğu görülmüştür. LPS'nin neden olduğu hiperaljezi 3 ve 10 mg/kg dozlarında DHA ile önlenmiştir. İmmünopresipitasyonun NLRX1 ile yapıldığı LPS uygulanan farelerin dokularında NLRX1, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , fosforile IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ , IKK $\gamma$  ile fosforile IKK $\gamma$  proteinlerinin ekspresyonu artmış, TRAF6 ile K63 U proteinlerinin ekspresyonu azalmış ve K48 U protein ekspresyonu değişmemiştir. Ayrıca, LPS uygulanan farelerin dokularında IkB-α protein ekspresyonu azalırken, fosforile IkB-α, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65 ve IL-1 $\beta$  proteinlerinin ekspresyonu artmıştır. DHA etkili olan düşük dozunda (3 mg/kg) uygulandığında ise, LPS'nin neden olduğu K63 U ve IkB-α protein ekspresyonundaki azalma ile fosforile IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ , fosforile IKK $\gamma$ , fosforile IkB-α, NF-κB p65, fosforile NF-κB p65 ve IL-1 $\beta$  proteinlerinin ekspresyonundaki artma önlenmiştir. Öte yandan, DHA, LPS'nin NLRX1, TRAF6, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  ve IKK $\gamma$  proteinlerinin ekspresyonunda neden olduğu değişiklikleri önlememiştir. **Sonuç:** Bulgularımız, NLRX1 ligandı DHA'nın enfamatuvár hiperaljeziyi önleyici etkisine, LPS'ye yanıt olarak santral sinir sisteminde TRAF6'dan ayrılan NLRX1'in, K63 U bağlantısı üzerinden ubikuitinlenmesindeki artışın ardından IKK kompleksine bağlanması sonucunda IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ , IKK $\gamma$ , IkB-α ve NF-κB etkinliği ile IL-1 $\beta$  protein ekspresyonundaki azalmanın katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür.

[Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (2019-3-TP3-3773) ve TÜBİTAK (219S353) tarafından desteklenmiştir.]

#### Anahtar Kelimeler

Lipopolisakkarit, Enfamatuvár hiperaljezi, NLRX1, TRAF6/IKK/IkB-α/NF-κB sinyal ileti yolu, Dokozahékzaenoik asit

**A decrease in the *traf6/ikk/ikb-a/nf-kb* signaling pathway activity contributes to the preventive effect of docosahexaenoic acid, a *nrx1* ligand, against Lps-induced inflammatory hyperalgesia**

**Dilşah Ezgi YILMAZ**, Şefika Pınar ŞENOL, Meryem TEMİZ-REŞİTOĞLU, Seyhan ŞAHAN-FIRAT, Bahar TUNÇTAN

Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mersin University, Mersin, Turkey

**Objectives:** The aim of this study was to investigate the effect of docosahexaenoic acid (DHA) on tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6/inhibitor of kB (IkB) kinase (IKK)/IkB- $\alpha$ /nuclear factor (NF- $\kappa$ B) pathway in relation to antiinflammatory nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor (NLR) X1 (NLRX1) in lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory hyperalgesia model in mice.

**Materials-Methods:** Mice were divided into 7 groups: (1) Saline, (2) LPS, (3) LPS+DHA (1 mg/kg), (4) LPS+DHA (2 mg/kg), (5) saline+DHA (3 mg/kg), (6) LPS+DHA (3 mg/kg) ve (7) LPS+DHA (10 mg/kg). DHA (10 ml/kg) was injected simultaneously with saline (10 ml/kg) or LPS (10 mg/kg) intraperitoneally. Reaction time to thermal stimuli within 30 seconds was evaluated in mice that received either saline or LPS after 6 hours. At the end of the experiments, brains and spinal cords were collected from animals. In the tissue homogenates, co-immunoprecipitation studies were conducted to determine the changes in the association of NLRX1 with TRAF6, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , phosphorylated IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ , IKK $\gamma$ , phosphorylated IKK $\gamma$ , K63- or K48-linked ubiquitinated (K63 U or K48 U) proteins. In addition, IkB- $\alpha$ , phosphorylated IkB- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65, phosphorylated NF- $\kappa$ B p65, and interleukin (IL)-1 $\beta$  protein expression by using the immunoblotting method.

**Results:** It was observed that 6 hours after LPS administration, the response time of mice to thermal stimulation was significantly less than those in the control group. LPS-induced hyperalgesia was prevented with 3 and 10 mg/kg doses of DHA. In the tissues of LPS-treated mice in which immunoprecipitation was performed with NLRX1, the expression of NLRX1, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , phosphorylated IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ , IKK $\gamma$ , and phosphorylated IKK $\gamma$  proteins was increased, the expression of TRAF6 and K63 U proteins was decreased, and the expression of K48 U protein did not change. In addition, IkB- $\alpha$  protein expression was decreased in the tissues of LPS-treated mice, while the expression of phosphorylated IkB- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65, phosphorylated NF- $\kappa$ B p65, and IL-1 $\beta$  proteins was increased. When DHA was administered at a low effective dose (3 mg/kg), it prevented the decrease in the expression of K63 U and IkB- $\alpha$  proteins and the increase in the expression of phosphorylated IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ , phosphorylated IKK $\gamma$ , phosphorylated IkB- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B p65, phosphorylated NF- $\kappa$ B p65, and IL-1 $\beta$  proteins in the NLRX1-immunoprecipitated tissues of LPS-treated mice. On the other hand, DHA did not prevent LPS-induced changes in the expression of NLRX1, TRAF6, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , and IKK $\gamma$  proteins.

**Conclusions:** Our findings suggested that, in the central nervous system, a decrease in the activity of IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ , IKK $\gamma$ , IkB- $\alpha$ , and NF- $\kappa$ B in addition to IL-1 $\beta$  protein expression as a result of binding to the IKK complex after increased ubiquitination via the K63 U linkage following dissociation of NLRX1 from TRAF6 in response to LPS contributes to the preventive effect of NLRX1 ligand, DHA, against inflammatory hyperalgesia.

[This work was supported by the grants from Mersin University (2019-3-TP3-3773) and TUBITAK (219S353).]

**İngilizce Anahtar Kelimeler**

Lipopolysaccharide, Inflammatory hyperalgesia, NLRX1, TRAF6/IKK/IkB- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway, Docosahexaenoic acid